Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. H. E. Bock

DIE ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER LEUCINAMINOPEPTIDASE DES MENSCHLICHEN URINS IM AGARGEL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Michael Langlotz

Erlangen 1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0063

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. H.E. Bock

DIE ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER LEUCINAMINOPEPTIDASE DES MENSCHLICHEN URINS IM AGARGEL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Langlotz
Erlangen
1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Nieth

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. H.-E. Bock

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG

A. Definition der Leucinaminopeptidase 1
B. Biochemische Daten 2
C. Biologische Funktionen 4
D. Bestimmung des Enzyms im Serum 4
E. Bestimmung des Enzyms im Urin 6

I. METHODIK

A. Herkunft des untersuchten Urins 9
B. Kurzfassung der Methode 10
C. Untersuchung zur Methodik 11
a) Bearbeitung des Urins 11
b) Elektrophorese 12
c) Anfärbung 23
d) Entfärbung 28
e) Trocknung 28
f) Auswertung 29

II. METHODENKRITIK

A. Reproduzierbarkeit 32
B. Qualitative Spezifität der Färbemethode 33
a) Anfärbung kristallisierter Leucinaminopeptidase 33
b) Elution der LAP aus dem Agar 34
C. Quantitative Spezifität der Färbemethode 39
D. Prüfung der Substratspezifität 39

III. LAP-AKTIVITÄTSVERTEILUNG IM URIN GESUNDER 44

IV. LAGE DER LAP-FRAKTIONEN IM EIWEISSPHEROGRAMM 46

V. DISKUSSION 48

ZUSAMMENFASSUNG 50

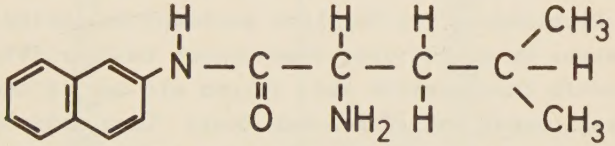
LITERATURVERZEICHNIS 51

E I N L E I T U N G

A. Definition der Leucinaminopeptidase

LINDERSTROM berichtete 1929 als erster über eine "Leucylpeptidase" als Komponente von Erepsin in der Darmmucosa (31). Er maß die Aktivität des Enzyms durch Bestimmung der aus L-Leucylglycin freigesetzten Carboxylgruppen. In den folgenden Jahren wurden Substrate mit höheren Hydrolyseraten entwickelt. 1939 führten BEHRENS und BERGMANN L-Leucinamid ein (5). Zur Messung der Peptidase-Aktivität in Körperflüssigkeiten und Organen arbeitete GOMORI 1954 eine kolorimetrische und histochemische Methode aus (21,23). Sie beruht auf der Bildung eines Azofarbstoffes aus Naphthylamin, welches bei der enzymatischen Spaltung von Glycin - oder Alanin-ß-naphthylamid als Substrat freigesetzt wurde (23).

GREEN (24) und FOLK (14) verwendeten in Weiterführung dieser Methode L-Leucin-ß-naphthylamid als Substrat für die Bestimmung der Leucinaminopeptidase.



L-Leucin-ß-naphthylamid (L B N A)

Die Isolierung eines L-Leucinamid spaltenden Enzyms gelang als erstem SPACKMANN im Jahre 1955. Das enzymatisch aktive Protein wies ein MG von 300 000 auf und wurde aus der Schweineniere gewonnen (57). GLÄSSER und HANSON reicherten 1963 das Enzym in kristallisierter Form an (16,17).

Es wurde ursprünglich angenommen, daß die Substrate L-Leucinamid und L-Leucin-ß-naphthylamid durch dasselbe Enzym hydrolysiert werden. PATTERSON und andere Autoren wiesen aber darauf hin, daß die genannten Substrate zwar von den gleichen Enzymen oder Enzymkomplexen jedoch mit unterschiedlichen Umsatzraten hydrolysiert werden (37,42,55). Man muß daher folgende

Unterscheidung treffen:

a) Das Enzym, das die höchste Umsatzrate für L-Leucinamid besitzt, hat die Internationale Enzymnummer 3.4.1.1 (44) und wird "klassische" oder "echte" Leucinaminopeptidase genannt. Es ist identisch mit dem von GLÄSSER, HANSON (16) und SPACKMANN (57) isolierten Enzym.

b) Die enzymatische Aktivität, die durch die Messung der Spaltung von L-Leucin-ß-naphthylamid (LBNA) erfaßt wird, hat noch keine Internationale Enzymnummer. Sie wird "sog. Leucinaminopeptidase", Aminopeptidase (7) oder Aminosäurearylamidase genannt (37).

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich das letzgenannte Enzym untersucht.

Es wird angenommen, daß bei der Messung der Hydrolyse von LBNA die Aktivität mehrerer Enzyme oder eines Enzymkomplexes erfaßt wird (36,37,55). Es handelt sich wahrscheinlich um eine Anzahl unspezifischer Peptidasen, die neben LBNA auch andere Peptide in unterschiedlichen Umsatzraten hydrolysieren können. Deshalb wird von der International Union of Biochemistry als umfassende Bezeichnung der Terminus Acylnaphthylamidaminohydrolase empfohlen. Da sich dieser Name jedoch im Schrifttum noch nicht allgemein durchgesetzt hat, folgen wir der in Deutschland üblichen Bezeichnung und nennen das Enzym "Leucinaminopeptidase" (LAP). Es sei aber noch einmal betont, daß wir uns in der vorliegenden Arbeit nur mit der LAP befassen, die als der Enzymkomplex definiert ist, der in der Lage ist, LBNA zu spalten.

Die in der klinischen Diagnostik durch eine vereinfachte Methode mit L-Leucin-p-nitranilid im Serum bestimmte LAP ist mit der oben definierten LAP identisch (37).

B. Biochemische Daten

Die Angaben über die biochemischen Eigenschaften der LAP sind nicht einheitlich.

GREEN und Mitarbeiter, die L-Leucin-ß-naphthylamid (LBNA) synthetisierten, geben folgende biochemische Daten für das En-

zym an (24) Im Rattennierenhomogenisat wurde bei Inkubation mit Veronalpuffer ein pH-Optimum der Enzymaktivität von 8,0 gemessen. Im menschlichen Serum dagegen wurde es bei 7,2 gefunden. Der Substratumsatz folgt einer Funktion nullter Ordnung bis zur achten Stunde. Danach fällt die Reaktionsgeschwindigkeit stark ab. Weder der Zusatz von L-Leucin noch von ß-naphthylamid beeinflußt die Reaktionsgeschwindigkeit. Die optimale Substratkonzentration liegt bei Werten über 200 µg/ml. Als Aktivatoren werden CN^- - Ionen und Ascorbinsäure angegeben, die in einer Konzentration von 0,001 M in Veronalpuffer von pH 8 die Aktivität der LAP der Rattenniere um 28 % bzw. 15 % erhöhen. Die Inhibitoren sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I

LAP-Inhibitoren nach GREEN und Mitarbeiter (24)

Inhibitor ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	Hemmwirkung in Prozent
Zn^{++}	100
Co^{++}	100
Cu^{++}	100
Ni^{++}	100
Cd^{++}	100
Fe^{++}	50
Mg^{++}	25
Mn^{++}	30
Ag^{+}	0

SMITH und Mitarbeiter geben ein pH-Optimum der LAP aus Lebercytolysat bei Inkubation mit Natriumsphosphatpuffer von pH 6,6 an (55). Im gleichen Material fanden sie die der halben maximalen Reaktionsgeschwindigkeit entsprechende Substratkonzentration (MICHAELISkonstante) von $7,0 \cdot 10^{-5}$ M. Als Aktivator geben sie nur Co^{++} - Ionen an, die in einer Konzentration von 0,2 mM um 30% aktivieren.

GOLDBARG und RUTENBURG ermittelten im Serum und Urin bei Inkubation mit Phosphatpuffer ein pH-Optimum von 7,2 (20).

Die MICHAELISkonstante im Urin wird mit $7,2 \cdot 10^{-5}$ M, im Serum mit $6,95 \cdot 10^{-5}$ M angegeben. Von ihnen wurden im nicht dialysierten Urin keine Inhibitoren und keine Aktivatoren gefunden.

KLAUS (26) gibt unterschiedliche pH-Optima und MICHAELISkonstanten für die LAP des Serums, des proteinfreien und des proteinhaltigen Urins an. Er fand für diese unterschiedlichen Lösungen pH-Optima von 5,8 - 7,0; 6,8 - 8,0 und 6,2 - 8,0 und bestimmte MICHAELISkonstanten von $2,5 \cdot 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$ und $2,9 \cdot 10^{-4}$ bei Inkubation in Phosphatpuffer. Bei seinen Untersuchungen erhöhten Co^{++} - Ionen die Aktivität der LAP um 44 %, während CN^{-} - Ionen und Monojodazetat die LAP-Aktivität um 100 % senkten.

BERGMANN gibt im dialysierten Urin ein pH-Optimum von 7,6 an (7). Im Gegensatz zu KLAUS fand er weder Aktivatoren noch Inhibitoren bei der Bestimmung der LAP im dialysierten Urin.

C. Biologische Funktion

Die biologische Funktion der LAP ist noch ungeklärt (55). Ihre intrazelluläre Lokalisation ist wahrscheinlich in den Lysosomen zu suchen (25).

In menschlichen Geweben sird sie in unterschiedlichen Konzentrationen vorgefunden (Tabelle II).

D. Bestimmung des Enzyms im Serum

Die LAP des Serums wird in der klinischen Diagnostik vorwiegend zur Differentialdiagnose des Ikterus verwandt (19,50). Bekannt ist insbesondere ein Anstieg der LAP beim Verschlußikterus. Erhöhte Werte wurden in der Literatur auch bei Schwangerschaft, Pankreaserkrankung, Dickdarm- und Rectumtumoren und anderen Erkrankungen beschrieben (9,20).

Mit Hilfe von Stärkegel-, Agargel-, Papierelektrophorese und Säulenchromatographie wurden im Serum verschiedene Proteine mit LAP-Aktivität gefunden (3,4,11,12,25,28,40,42,43,45,46, 52). Ob es sich dabei um Isoenzyme, d.h. Enzyme mit gleicher Substratspezifität aber unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften, oder um verschiedene substratunspezi-

Tabelle II

LAP-Gehalt menschlicher Gewebe nach GREEN u. Mitarb. (24)

Gewebshomogenisat	LAP-Konzentration (microgramm-ß-naphthylamin gebildet /h/mg Gewebe)
Gehirn (Occipitalbereich)	3,0
Skelettmuskel	2,7
Ileum	2,5
Niere	2,4
Colon	2,3
Milz	2,3
Prostata	2,3
Testis	2,2
Leber	2,0
Magen	1,2
Pankreas	1,2
Aorta	1,0
Blase	0,9
Mamma	0,8
Thymus	0,7
Fettgewebe	0,5
Oesophagus	0,5
Uterus	0,3

fische Peptidasen handelt, ist ungeklärt. Die Mehrzahl der Autoren vermeidet die Bezeichnung Isoenzyme. Im Serum Gesunder fanden sich je nach Methode und Autor 1 - 4 Fraktionen. Bei Schwangerschaft, Leber- und Pankreaserkrankungen wurden 3 - 7 weitere Fraktionen gefunden.

SMITH und RUTENBURG (53) zeigten, daß auch Organe und Körpersäfte des Menschen eine heterogene LAP-Zusammensetzung aufweisen (Abb. 1). Da jedoch eine Gesetzmäßigkeit im Auftreten der verschiedenen Fraktionen im Serum bei verschiedenen Organerkrankungen nicht erwiesen ist, wird auf eine detaillierte Darstellung der einzelnen Befunde verzichtet.

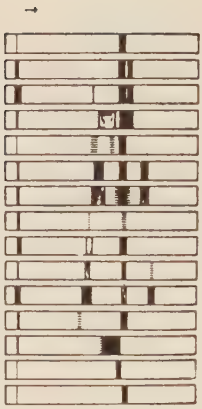


Abb. 1: LAP-Fraktionen menschlicher Gewebe (5)

E. Bestimmung des Enzyms im Urin

Die mittlere LAP-Aktivität im Urin von Normalpersonen wird mit 7,75 mU/ml angegeben (8). Ein Anstieg der Aminopeptidaseaktivität im Urin bei verschiedenen renalen und extrarenalen Erkrankungen wurde von mehreren Autoren beschrieben (2,6,7,8,19, 20,45,58).

SCHELER und BERGMANN fanden beim schweren akuten Nierenversagen unterschiedlicher Ätiologie eine starke Aktivitätserhöhung der LAP, die ihren Gipfel zwischen dem 6. bis 10. Tag erreichte und am 30. Tag nach kontinuierlichem Abfall auf Normalwerte sank (45). Ähnliche Befunde wurden von GOLDBARG und RUTENBURG (19) angegeben. Ein erneuter Anstieg in der Erholungsphase soll ein Rezidiv anzeigen.

BERGMANN fand bei akuter und subakuter Glomerulonephritis ebenfalls einen Aktivitätsanstieg im Urin (7). SZÁSZ berichtete über eine vermehrte Aktivität der Urin-LAP beim nephrotischen Syndrom (58).

Neben nephrotoxischen Substanzen und einigen Antibiotika soll auch größerer Gewebszerfall nach Bestrahlungen, Verbrennungen und Operationen zur Aktivitätserhöhung der LAP im Urin führen (7).

Außer der LAP werden bei diesen Erkrankungen auch andere Enzyme vermehrt im Urin ausgeschieden, wie die Lactatdehydrogenase, die Alkalische Phosphatase, die ß-Glucuronidase und die beiden Transaminasen GOT und GPT (6,58).

Über die Ursachen der Enzymausscheidung im Urin ist nichts Sicheres bekannt. KLAUS nimmt an, daß die Enzyme im Urin von Gesunden nicht aus dem Serum, sondern der Niere stammen (26). Diese Vermutung bietet sich an, weil die Niere ein enzymreiches Organ ist, was aus histochemischen Arbeiten (13,21,34,36,47,59) und Stoffwechseluntersuchungen (40,38,39,51) hervorgeht. Im Gegensatz zu anderen Enzymen der Niere ist die LAP ausschließlich im lumennahen Cytoplasma der proximalen Tubulusepithelien lokalisiert, dort aber in hoher Konzentration (10,18,34,35).

BERGMANN sieht einen direkten Zusammenhang zwischen Läsionen der Zellen des proximalen Tubulus und dem Anstieg der Urin-LAP (6) (Abb. 2).

Über diese Zusammenhänge könnten am ehesten Isoenzymuntersuchungen Aufschluß geben, wenn man wie für die LAP des Serums auch im Urin eine Heterogenität annimmt, aus der sich eventuell die Organherkunft des Enzyms ableiten ließe. Die Heterogenität der LAP könnte aber auch, wie es mit anderen Enzymen, z.B. der LDH (15), möglich ist, zu diagnostischen Zwecken ausgewertet werden. Hinweise für eine derartige Heterogenität finden sich bei SMITH und RUTENBURG, die in der Niere des Menschen zwei LAP-Fraktionen nachwiesen (53). MONIS fand bei Ratten sowohl im Urin als auch in der Niere zwei Fraktionen (31).

Es war unser Ziel, eine zuverlässige und in der klinischen Diagnostik anwendbare Methode auszuarbeiten, die das Enzymspektrum der Urin-LAP erkennen läßt.

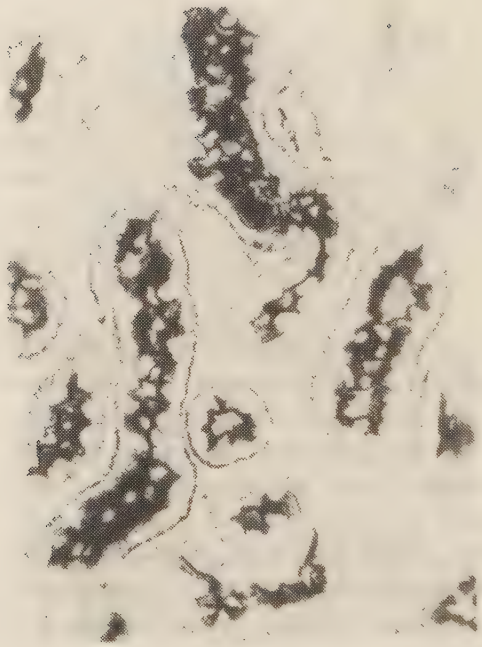


Abb. 2: Histochemische Darstellung der LAP im Bürstensaum des proximalen Tubulusepithel (10)

I. METHODIK

A. Herkunft des untersuchten Urins

Zur Entwicklung der Methode verwandten wir aus einer größeren Anzahl von Patientenurinen den mit der höchsten Aminopeptidase-Aktivität / ml Urin. Er stammte von einem Patienten mit Amyloidnephrose.

Es folgen einige Daten aus der Krankengeschichte des Patienten (geb. 1942): Bis auf eine Appendektomie im 15. Lebensjahr war der Patient gesund. 1961 mußte der rechte Oberschenkelkopf wegen einer Osteomyelitis entfernt werden, nachdem drei Wochen vorher ein Furunkel an der Stirn aufgetreten war. An der Operationsstelle bildete sich eine eiternde Fistel. Im September 1964 traten plötzlich Oedeme an den Unterschenkeln bei einer gleichzeitigen Proteinurie von 12 g/die auf. Bei der Einweisung in die Medizinische Universitätsklinik Tübingen am 5.1.1965 wurde folgender pathologischer Befund erhoben: Rechte Hüfte versteift, starkes Lymphoedem im Bereich der rechten Oberschenkelweichteile, osteomyelitische Fistel unter dem rechten Leistenband, Oedeme der Unterschenkel.
Laborbefunde: Hb 14,4 g%, Erythrozyten 4,5 Mill., Leukozyten 11 700 /mm^3. Harnstoff 22 mg%, Harnsäure 4 mg%, Kreatinin 0,79 mg%, Gesamteiweiß 3,9 g%. Serumelektrophorese: Albumine 46, α_1- = 6, α_2- = 13, ß- = 13, γ-Globuline = 22 rel.%. Proteinurie 6,8 g/die.
Auf Grund der Rectumbiopsie wurde die Diagnose periretikuläre Amyloidose gestellt. Die Nierenbiopsie ergab eine mäßig schwere Nierenamyloidose vom Typ der kapillären Amyloidablagerung.

Es erfolgte eine intensive antibiotische Therapie. Trotzdem stieg die Proteinurie auf über 20 g/die. Das Gesamteiweiß verringerte sich auf 3,6 g%. Zusätzlich trat eine doppelseitige Pneumonie und eine Thrombophlebitis auf. Der Patient hatte Druckschmerzen in der rechten Inguinalgegend und ständig subfebrile Temperaturen. Eine operative Beseitigung des osteomyelitischen Herdes gelang nicht. Deshalb wurde am 5.11.1965 das rechte Bein exartikuliert. Nach der Amputation besserte

sich der Befund. Vier Rectumbiopsien ergaben einen deutlichen Rückgang der Amyloidose. Im August 1966 sanken die Leukozyten auf 5 500 /mm^3, die BSG auf 20/37 mm n.W. und die Proteinurie auf 5 g/die. Der Cholesterinspiegel lag bei 325 mg%. Das Gesamteiweiß im Serum stieg auf 4,2 g%, Albumin 44, α_1- = 6, α_2- = 24, ß- = 18, γ-Globuline 8 rel.%. Der Urin wies Bakterien und 2 - 3 Leukozyten sowie 1 - 2 Erythrozyten/Blickfeld auf. Bei Wohlbefinden wurde der Patient am 27.5.1966 entlassen.

Die im folgenden dargelegten methodenkritischen Untersuchungen wurden mit einer Urinprobe vom 20.5.1966 ausgeführt. Es folgen die chemischen und mikroskopischen Befunde des Patienten von diesem Tag:

Urinbefund: pH 5, spez. Gewicht 1026, Zucker negativ, Urobilinogen +/+, Sediment: org. und anorg. Salze, Bakterien positiv, 0 - 1 Erythrozyten/Blickfeld, Hyaline Zylinder. LAP 19 mU/ml Urin, 9,9 g Eiweißausscheidung/die. Urinelektrophorese vom 25.5.: Albumin 76, α_1- = 5, α_2- = 5, ß- = 9, γ-Globuline = 5 rel.%.

Serumbefund: 4,2 g% Eiweiß, Serumelektrophorese vom 18.5.: Albumin 44, α_1- = 6, α_2- = 23, ß- = 20, γ-Globuline = 7 rel.%. Kreatinin 0,5 mg%, Harnstoff 24 mg%, Harnsäure 4,5 mg%. Hb 15,5 g%. BSG 52/78 mm n.W.

Therapie: 1 x tägl. 25 mg Esidrix (seit 1.1.1966) und 5 mg Endabol (seit 6.5.1966).

B. Kurzfassung der Methode

Zur Orientierung folgt eine kurze Beschreibung der Methode. Der Urin wurde filtriert, vier Stunden lang gegen fließendes Leitungswasser dialysiert, mit Kaltluftföhn eingeengt und bei 4°C aufbewahrt.

Veronal-Na-Puffer von einer Ionenstärke 0,05 μ und einem pH 8,4 wurde mit Agarose* zu einer 0,9 % Agarlösung angesetzt und in einem Erlenmeyerkolben mit Zellstoffkorken für ca. eine Stunde im Brutschrank von 120°C erhitzt. Nach Verflüssigung

---

* Behringwerke, Marburg/Lahn

wurde der homogene Agar lauwarm auf Objektträger bis zu einer Schichtdicke von 1,5 mm gegossen und in einer feuchten Kammer bei 4°C aufbewahrt.

Vor der Elektrophorese wurden die Elektrophoresewannen mit einem Veronalpuffer von pH 8,4 und einer Ionenstärke von 0,1 μ gefüllt. Daraufhin wurden Gräben im Agar durch Einstecken eines Papierstreifens hergestellt. Nach dem Auftragen der Urinprobe folgte die Elektrophorese im LKB Gerät Nr. 3276 BN*: t^{o} = +4°C, h = 1 3/4 Std., Klemmspannung = 250 V, I = 10 mA. Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger eine Stunde lang mit einer Lösung inkubiert, die 0,2 M Trismaleatpuffer von pH 6,6 und LBNA in einer Konzentration von $1{,}3 \cdot 10^{-4}$ enthielt. Der Inkubation schloß sich die Färbung der Enzymbanden an. Die Färbelösung besteht aus dem Substrat LBNA und dem Farbstoff: diazotiertes p-nitro-benzolazo-2,5-dimethoxyanilin (Fast Black Salt K)** in einer Konzentration von 20 mg%. Nach einer halben bis zu einer Stunde färbten sich die Enzymbanden blau. Inkubation und Anfärbung erfolgten bei 37°C im Dunkeln. Anschließend wurden die nichtgebundenen Reste des in den Agar diffundierten Farbstoffs Fast Black Salt K durch ein Methanol-Eisessig-Aquadest-gemisch im Verhältnis 2 : 1 : 7 ausgewaschen. Der Vorgang dauerte ein bis zwei Tage. Zum Schluß wurden die Präparate bei 37°C im Brutschrank getrocknet und mit dem Extinktionsschreiber*** ausgewertet.

C. Untersuchungen zur Methodik

a) Bearbeitung des Urins

Es wurde im Hinblick auf die Untersuchungen BERGMANN's (6) nur Urin verwendet, der nicht älter als 5 Stunden war. Zur Reinigung von zellulären und anderen groben Bestandteilen wurde

---

* LKB-Productor AB, Box 12220, Stockholm 12, Schweden.

** Serva, Heidelberg: Nr. 21260.

*** RB Analytrol der Firma Beckman, Stanford Industrial Park, Palo Alto, Calif., U.S.A.

der Urin filtriert* und anschließend gegen fließendes Leitungswasser mindestens vier Stunden dialysiert**. Die Harnstoffkonzentration sinkt dabei auf ungefähr 1 % des Ausgangswertes (Abb. 3).

Nach BERGMANN (6) ist ein Aktivitätsverlust der LAP durch die Dialyse des Urins gegen Leitungswasser nicht zu befürchten.

Da die Enzymaktivität im Nativharn sich zur elektrophoretischen Bearbeitung als zu gering erwies, engten wir den Urin anschließend in einem Kaltluftstrom auf 0,2 - 2 % seines Ausgangsvolumens ein. Dies geschieht in durchschnittlich sechzehn Stunden. Das Ausgangsmaß der Einengung ist dabei abhängig vom Eiweißgehalt des Nativharns. Die Anwendung einer Unterdruckdialyse brachte in Vergleichsuntersuchungen keine Vorteile.

Der eingeengte Urin wurde bis zur Enzymauftrennung bei $+4^{o}C$ aufbewahrt.

b) Elektrophorese

1. Wahl und Zubereitung des Agars

Von den im Handel erhältlichen Agartypen Agarose***, Difco Special Agar Noble****, Bacto-Agar, Ionoagar Nr. 2***** erwies sich uns Agarose als das geeignetste Medium für die LAP-Auftrennung. In Agarose färbten sich die Enzymbanden am stärksten und waren am schärfsten voneinander getrennt, so daß nur in Agarose vier LAP-Fraktionen zur Darstellung kamen (Abb. 4).

Agarose ist der chemisch am exaktesten definierte Agar (1). Er hat die empirische Formel $(C_{12}H_{14}O_5(OH)_4)n$ und besteht aus einer Kette von Disacchariden. Diese sind aus ß-D-galactopyranose und 3,6-anhydro-L-galactose zusammengesetzt. Agarose ist der ionenärmste Agar. Nach WIEME hat Agarose eine geringe Elek-

---

* Selecta Faltenfilter 5§5 1/2, Firma Carl Schleicher und Schüll, Dassel.

** Dialysierschläuche Nr. 12948, 18 x 20, Kalle AG, Wiesbaden, Biebrich.

*** Behringwerke, Marburg/Lahn.

**** Difco Detroit, Michigan, U.S.A.

***** Oxo. London, E.C. 4, England.

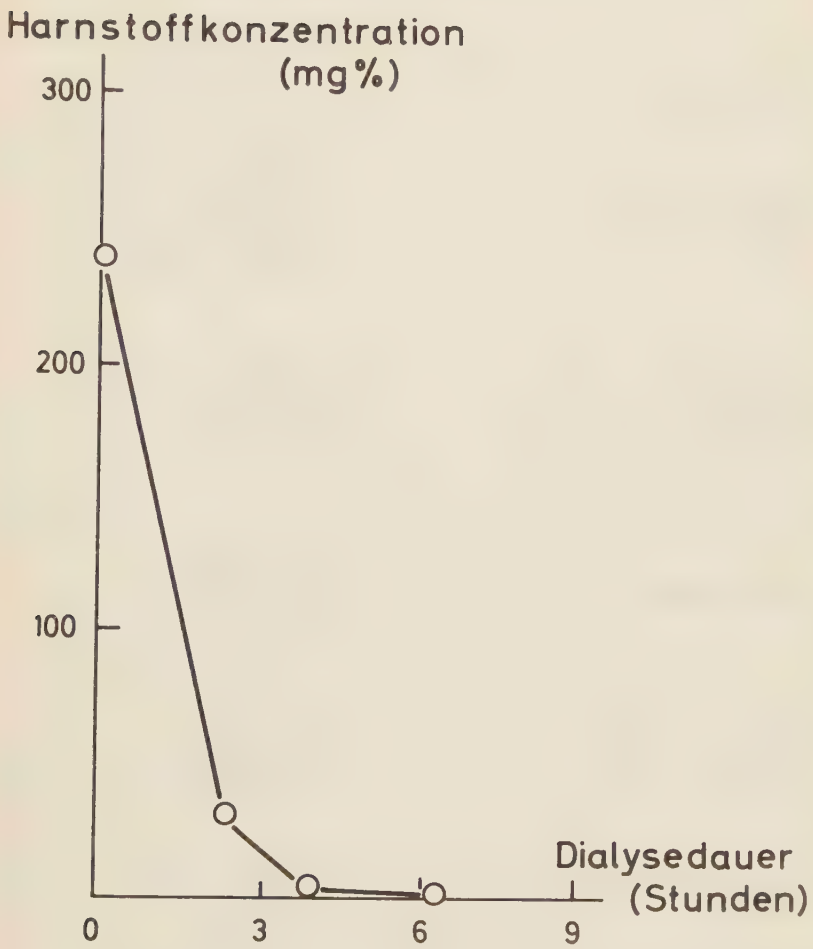


Abb. 3: Abnahme der Harnstoffkonzentration des Urins während der Dialyse gegen fließendes Leitungswasser

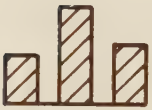
Agarsorten	Fraktionen
Agarose	
Behring Agar	
Ionoagar Nr. 2	
Bacto Agar	
Difco Noble Agar	

Abb. 4: Anzahl und Farbintensität (Extinktions-Einheiten in rel.%) der LAP-Fraktionen in Abhängigkeit von der Agarsorte

troosmose und eine gegenüber allen anderen Agarsorten nur geringe Tendenz Protein auszufällen (60). Die gute Auftrennung beruht möglicherweise auf diesen Eigenschaften.

2. Agarkonzentration

Wir wählten eine Agarkonzentration von 0,9 %. Bei niedrigerer Konzentration hat der Agar eine so geringe Konsistenz, daß die zum Serumauftrag notwendigen Gräben nicht mehr ausgestanzt werden können. Höhere Agarkonzentrationen setzen die Wanderungsgeschwindigkeit zu sehr herab und führten zur Eiweißausfällung. Sie sind deshalb zu vermeiden. Außerdem lassen sich unspezifische Farbniederschläge nicht so gut auswaschen.

3. Puffer

Als Elektrophoresepuffer wird von MONIS (33), RUTENBURG (40), SCHOBEL und WEWALKA (49) entsprechend der Stärkegelelektrophorese nach SMITHIES (56) ein Boratpuffer vorgeschlagen, von KLAUS und BIRON (27) im Agar ein Veronalpuffer und von METHFESSEL (32) zur Papierelektrophorese Trispuffer. Nach METHFESSEL (32) wird die Enzymaktivität der LAP aus Rinderaugenlinse von Trispuffer am geringsten beeinflußt.

Wir untersuchten Veronal-, Phosphat-, Borat- und Trispuffer im Agar bei einem pH 8,4 und einer Ionenstärke 0,05 µ. Der gleichzeitig verwendete Wannenpuffer hatte ein pH 8,4 und eine Ionenstärke 0,1 µ. Bei Anwendung von Phosphat- und Trispuffer wanderte die Fraktion 1 schmalbasiger und schneller als sonst. Sie hatte annähernd die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie Albumin. Im Boratpuffer ließen sich nur zwei Fraktionen nachweisen. Lediglich im Veronalpuffer gelangten vier Fraktionen zur Darstellung. Wir entschieden uns daher für Veronalpuffer.

4. Ionenstärke des Agarpuffers

Es ergab sich dann die Frage nach der günstigsten Ionenstärke des Puffers. Wir untersuchten daher Ionenstärken von 0,025 - 0,15 µ im Agarpuffer, bei einem Wannenpuffer mit der Ionenstärke 0,1 µ. Bei der Wahl der Ionenstärke ist ein Auskristallisieren des Agars infolge der JOULEschen Wärmeentwicklung während des Elektrophoresevorganges und eine stärkere En-

zyminaktivierung durch eine zu hohe Ionenstärke des Agarpuffers der limitierende Faktor. Niedere Ionenstärken haben zwar den Vorteil größerer Wanderungsgeschwindigkeiten und damit kürzerer Auftrennzeiten, beeinträchtigen jedoch die Schärfe der Enzymauftrennung erheblich. Uns erwies sich im Agarpuffer eine Ionenstärke von 0,05 μ als am vorteilhaftesten. Die erste Fraktion erreichte dabei in zwei Stunden eine Wanderweite von 3 cm bei einer Klemmspannung von 200 V und einer Stromstärke von 6 mA.

5. Ionenstärke des Elektrodenpuffers

Im Elektrodenpuffer wurden Ionenstärken von 0,05 - 0,2 μ getestet. Die Verwendung von Veronalpuffer mit einer Ionenstärke über 0,2 μ war unmöglich, da dieser Puffer dann bei einem pH 8,4 und einer Temperatur von +4°C auskristallisierte. Der Anstieg der Wanderungsgeschwindigkeit der Enzymfraktionen bei Erhöhung der Ionenstärke von 0,05 μ auf 0,1 μ bzw. 0,2 μ betrug 20% bzw. 30% (Abb. 5).

Das günstigste Verhältnis von Ionenstärke zu Wanderungsgeschwindigkeit bot ein Puffer von 0,1 μ Ionenstärke. Dabei legte die erste Fraktion in drei Stunden bei einer Klemmspannung von 200 V und einer Stromstärke von 10 mA einen Weg von 4 cm zurück. Diese Ionenstärke im Elektrodenpuffer verwandten wir daher in unseren folgenden Untersuchungen.

6. Puffer - pH

Als pH-Wert des Elektrophoresepuffers wird bei der Elektrophorese der Serum-LAP im Stärkegel ein pH von 8,65 (49) und im Agargel ein pH von 8,6 (27) angegeben. Von uns wurde das pH-Optimum des Elektrophoresepuffers (d.h. Agar- und Elektrodenpuffers) im Bereich von pH 7,5 - 9,5 getestet. Ein Veronalpuffer mit einem pH 8,0 oder niedrigeren Werten und einer Ionenstärke von 0,1 μ kristallisiert bei 4°C aus und war daher nicht zu verwenden.

Bei höheren pH-Werten wurde die Enzymanfärbung umso schwächer, je weiter der pH-Wert sich von 8 entfernte (Abb. 6).

Dies ist zweifellos darin begründet, daß das pH-Optimum

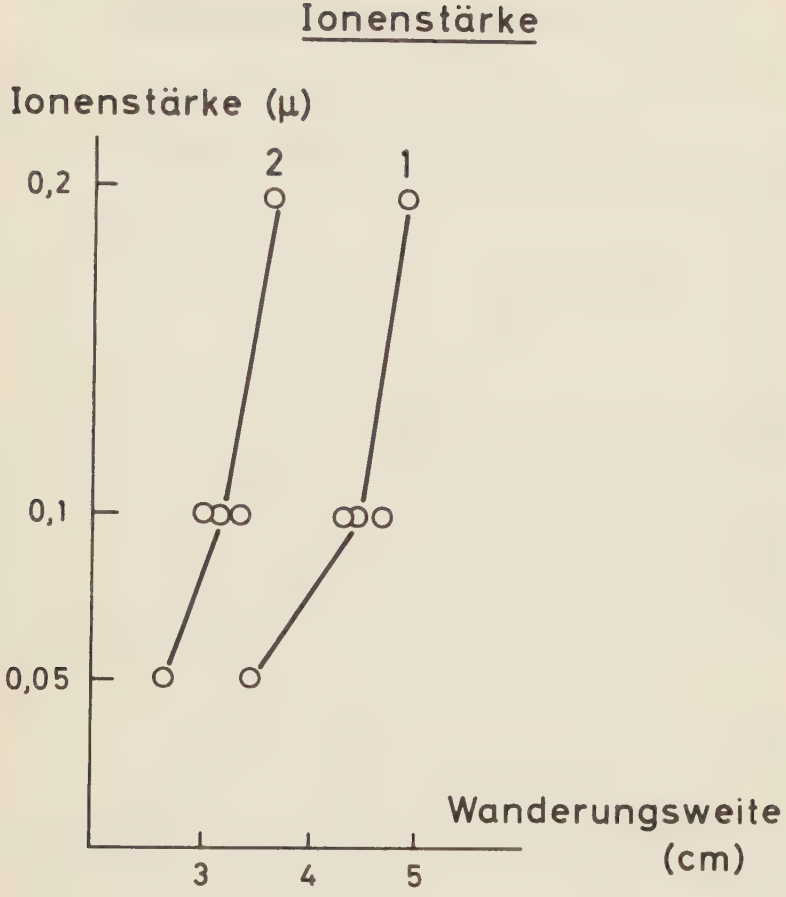


Abb. 5: Wanderweite der Fraktionen (1, 2) in Abhängigkeit von der Ionenstärke (U = 200, mA = 6, Elektrophorese-Dauer = 3 Std.)

pH-Optimum des Agarpuffers

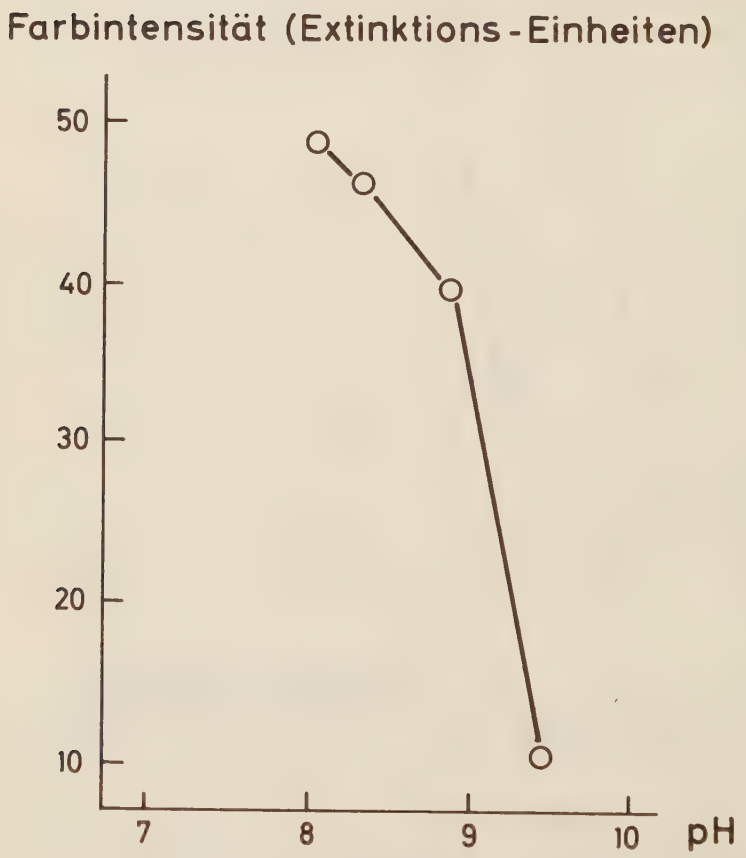


Abb. 6: Farbintensität des Enzyms in Abhängigkeit vom pH-Wert des Agarpuffers

der LAP zwischen 7 und 8 liegt. Deshalb wählten wir zur Elektrophorese ein pH des Puffers von 8,4.

7. Zubereitung des Agars

Der Ansatz Puffer und Agar wird für 45 - 60 Minuten in einen Wärmeschrank von 120°C gestellt. Die Lösung soll nach dieser Zeit völlig homogen und schlierenfrei sein.

Sie wird dann auf vorbereitete Objektträger gegossen, 5 ml pro Träger. Nach Erhärten des Agars werden die Agarplättchen auf den Objektträgern für mindestens 24 Stunden aufbewahrt, da nach 24 Stunden die Elektroosmose der Agarplatten, die die Wanderungsweite beeinflußt, konstant bleibt (60).

8. Anfertigung des Grabens

Schlitze für den Urinauftrag im Agar werden durch zugeschnittene Filterpapierstreifen* angebracht, die kurz mit der Breitseite in den kalt- und konsistentgewordenen Agar gestoßen werden (60). Sie saugen Flüssigkeit aus dem Agar und schaffen dadurch einen leeren Graben. Wir wählten eine Breite der Streifen von 1 cm, steckten sie in 1 cm Entfernung vom kathodischen Ende des Objektträgers in den Agar und ließen sie etwa drei Sekunden stecken. Dadurch wurde eine Grabenbreite unter 1 mm erreicht.

9. Auftrag der Urinprobe

Die Urinprobe wird mit einer feinen Pipette in den Agargraben eingefüllt. Die Auftragsmenge in Abhängigkeit von der LAP-Aktivität ist für die Enzymauftrennung von großer Bedeutung. Es wurden Auftragsmengen von 0,6 - 3,9 µl getestet.

Bei einer Urinmenge von 0,9 µl mit einer im Normbereich liegenden LAP-Aktivität ließ sich die vierte und schwächste Fraktion nicht sicher darstellen. Bei einer Menge von 3,9 µl wurden die ersten beiden Fraktionen nicht immer voneinander getrennt. Deshalb wählten wir eine Auftragsmenge von etwa 1,5 µl. Nach dem Einfüllen des Urins wurde sofort die Elektrophorese begonnen.

---

* Schleicher und Schüll, Dassel, Nr. 2043.

10. Elektrophoresebedingungen

Die Elektrophorese erfolgte im Kühlraum bei 4°C mit dem LKB-Gerät Nr. 3276 BN*. Es besteht im wesentlichen aus zwei Elektrodengefäßen mit Anode und Kathode, einer Polystrol-Kasette, die als Brücke über den Gefäßen liegt, und zwei Rayondochten, die Agar und Puffer verbinden. Im LKB-Gerät können gleichzeitig bis zu achtzehn Präparate aufgetrennt werden (Abb. 7).

Bei der Wahl der Elektrophoresebedingungen gingen wir davon aus, daß die Aktivität der klassischen Leucinaminopeptidase nach 7 1/2 stündiger Elektrophoresedauer auf 21,2 % des Ausgangswertes absinkt (32). Das Ziel mußte daher darin liegen, die Elektrophoresedauer nach Möglichkeit zu verringern, um dadurch bedingte Aktivitätsverluste zu vermeiden. Dies geschieht am besten durch einen möglichst hohen Spannungsabfall pro cm/ Wegstrecke im Pherogramm, da mit zunehmender Stromspannung ein Ansteigen der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit zu erreichen ist (Abb. 8). Begrenzt wird jedoch die Höhe der möglichen Spannung durch die parallel ansteigende Stromstärke und die dadurch bedingte Entwicklung der JOULEschen Wärme. Beides beeiträchtigt die Enzymaktivität und die Schärfe der Auftrennung.

Es wurden Stromspannungen von 150 V, 200 V und 250 V getestet. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die am Speisegerät abgegriffenen Klemmspannungen. Die dabei ebenfalls im Speisegerät gemessenen Stromstärken betrugen 5, 7,5 und 10 mA. Höhere Stromspannungen als 250 V kamen nicht in Betracht, da der Agar durch die JOULEsche Wärme eintrocknete. Bei Anwendung der oben genannten drei verschiedenen Stromspannungen ergaben sich qualitativ und quantitativ gleiche LAP-Auftrennungen. Da die LAP-Aktivität mit der Elektrophoresedauer abnimmt, aber nicht von der Stromspannung in dem von uns gewählten Bereich beeinflußt wird (32), wählten wir eine Spannung von 250 V. Dabei besteht ein Spannungsabfall von 4,5 V/cm Agarfläche.

Die Abhängigkeit der Wanderungsweite der einzelnen Enzym-

* LKB Productor AB, Postfach 12220, Stockholm 12, Schweden.

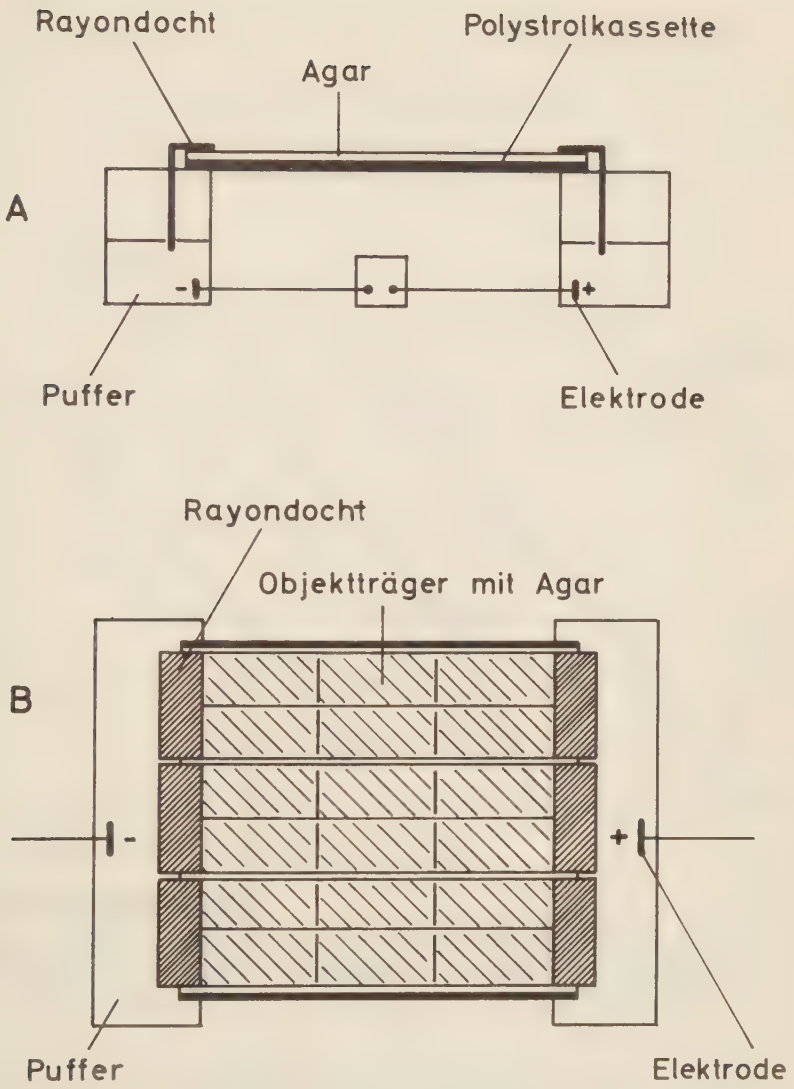


Abb. 7: Elektrophoresegerät: A Seitenansicht
B Aufsicht

Stromspannung (U)

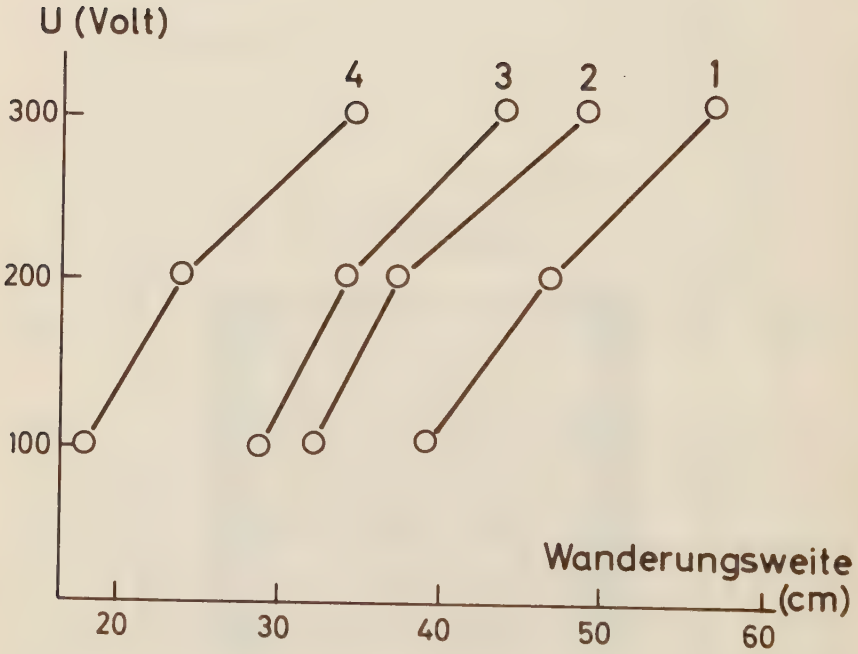


Abb. 8: Wanderungsweite in Abhängigkeit von der Klemmspannung. Dauer der Auftrennung: 2 1/2 Std.
1-4: LAP-Fraktionen

fraktionen von der Elektrophoresedauer zeigt Abb. 9.

Zu einer guten Trennung der einzelnen Enzymfraktionen ist eine Mindestwanderungsweite der Fraktion 1 von 4 cm erforderlich. Das entspricht bei einer Klemmspannung von 250 V und drei hintereinander gelagerten Objektträgern einer Stromstärke von 10 mA und einer Elektrophoresedauer von ein dreiviertel Stunden.

c) Anfärbung

Die färberische Darstellung der LAP im Agargel erfolgt in einer Pufferlösung, der das spezifische Substrat des Fermentes und ein Farbstoff zugesetzt werden.

Der chemische Prozeß der Anfärbung verläuft dabei in zwei Schritten (Abb. 10).

(1) L - Leucin - ß - naphthylamid

L A P ⟶ ↓

L - Leucin + ß - naphthylamin

(2) ß - naphthylamin + Fast Salt Black K (Diazoniumsalz)

↓

Diazotierfarbstoff (blauer Niederschlag)

Durch diese Reaktion färben sich die vorher im Agar nicht sichtbaren LAP-Fraktionen blau an.

1. Puffer

Als Puffer verwendeten wir Trismaleatpuffer, da METHFESSEL (32) nachwies, daß Trispuffer die Enzymaktivität der klassischen LAP weniger beeinträchtigt als Veronal- oder Boratpuffer.

2. Puffer - pH

Bei getrennter Prüfung der enzymatischen Spaltung und des Diazotierungsprozesses stellten wir fest, daß Reaktion (1) und (2) verschiedene pH-Optima aufweisen. Es wurde daher der Einfluß verschiedener H-Ionenkonzentrationen des Trismaleatpuffers

Elektrophoresedauer

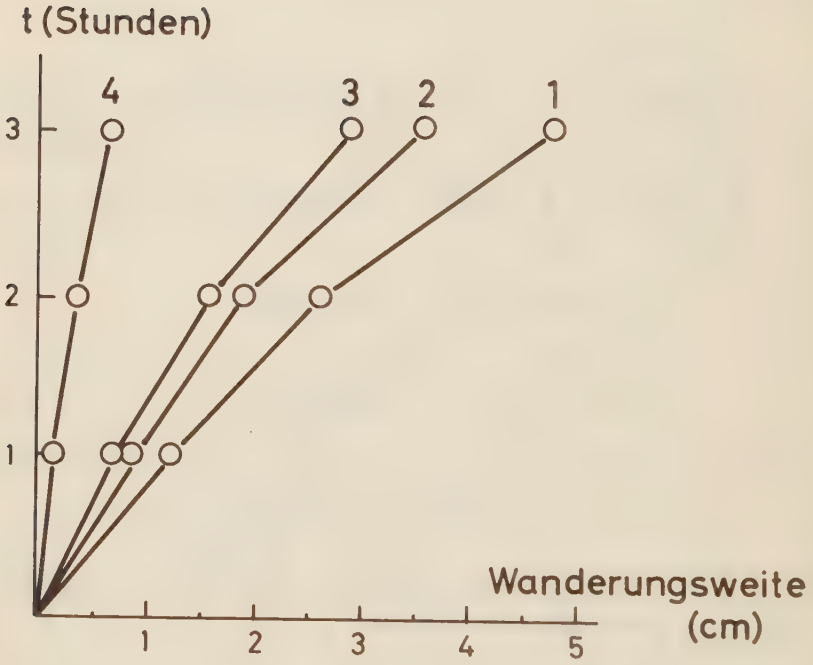


Abb. 9: Wanderungsweite der vier Fraktionen (1 - 4) in Abhängigkeit von der Elektrophoresedauer (U = 200 V, I = 6 mA)

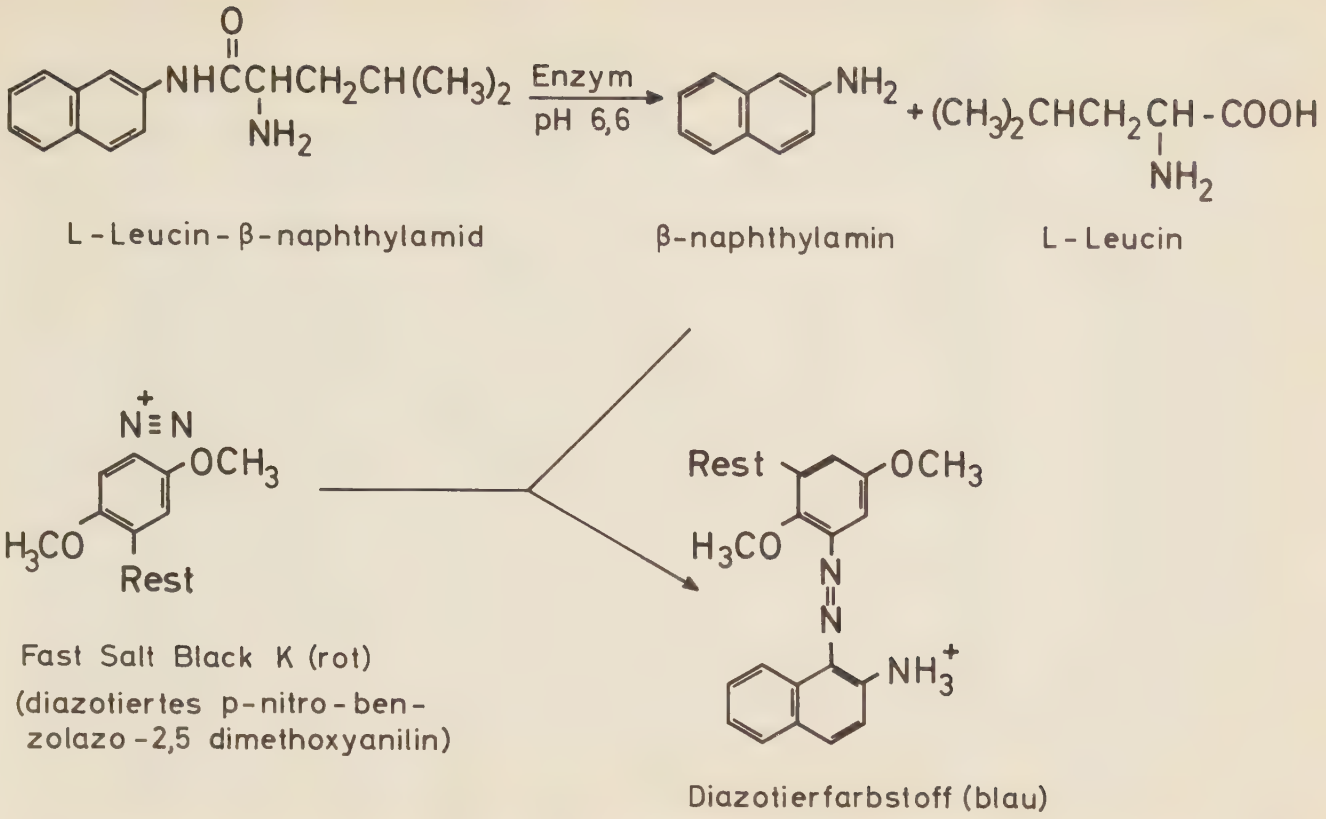


Abb. 10: Darstellung der Urin-LAP im Agargel durch Bildung eines Diazotierfarbstoffes

auf beide Reaktionen untersucht. Die Enzymaktivität steigt von pH 5,5 bis 6,6 in der Inkubationslösung um mehr als das Doppelte an, um dann wieder bei höheren pH-Werten abzufallen. Bei pH 8,5 war keine Aktivität mehr nachzuweisen. Das pH-Optimum der Anfärbelösung dagegen lag bei 5,0. Niedrigere und höhere pH-Werte gaben eindeutig geringere Enzymaktivitäten (Abb. 11).

Um optimale Bedingungen für beide Reaktionen zu erreichen, mußten wir daher beide Schritte mit getrennt angesetzten Trismaleatlösungen von verschiedenen pH-Werten vornehmen. Durch ein solches Vorgehen wird gleichzeitig eine andere Schwierigkeit gelöst, die insbesondere beim Nachweis geringer LAP-Aktivitäten auftritt. Das ungekoppelte Fast Salt Black K ist ein den Agar intensiv rot färbendes Salz. Bei geringer LAP-Aktivität heben sich daher die blauen LAP-Banden nur schwach von dem rot gefärbten Untergrund ab. Durch eine Teilung des Färbevorgangs wird der Agar dem ungekoppelten Fast Salt Black K und damit seiner Rotfärbung kürzer exponiert.

Die Trennung der beiden Färbeschritte ist nur bei geringer Enzymaktivität notwendig. Bei genügender LAP-Aktivität (20 mU/ml Urin) ließen wir die enzymatische Spaltung des LBNA und die Kopplelung des ß-naphthylamin zum blau gefärbten Diazo-Salz gleichzeitig in einem Ansatz ablaufen bei einem pH-Wert von 6,0. Als Substrat verwendeten wir wie erwähnt LBNA. Es wurde zwar von NACHLASS und Mitarbeiter (35) L-Leucin-4-Methoxy-ß-naphthylamid* empfohlen, das schneller als LBNA umgesetzt werden soll. Aber in von uns angestellten Parallelversuchen mit diesem Substrat zeigten sich keine wesentlichen Vorteile. Erwähnt werden soll auch der nicht unerheblich höhere Preis dieses noch nicht lange auf dem Markt erhältlichen Präparats.

Bei Prüfung verschiedener Substratkonzentrationen von $1{,}3 \cdot 10^{-6}$ M bis $1{,}3 \cdot 10^{-3}$ M ml LBNA erwies sich uns die Konzentration von $1{,}9 \cdot 10^{-4}$ M am günstigsten.

Als Farbstoff wurde Fast Salt Black K und Fast Salt Blue B untersucht. Nur Anfärbungen mit Fast Salt Black K ergaben eine gute Farbintensität. Es empfiehlt sich, die fertige Farblösung

---

* Cyclo Chemical Corporation, Los Angeles, Calif., U.S.A.

pH-Optima der Färbungsreaktion

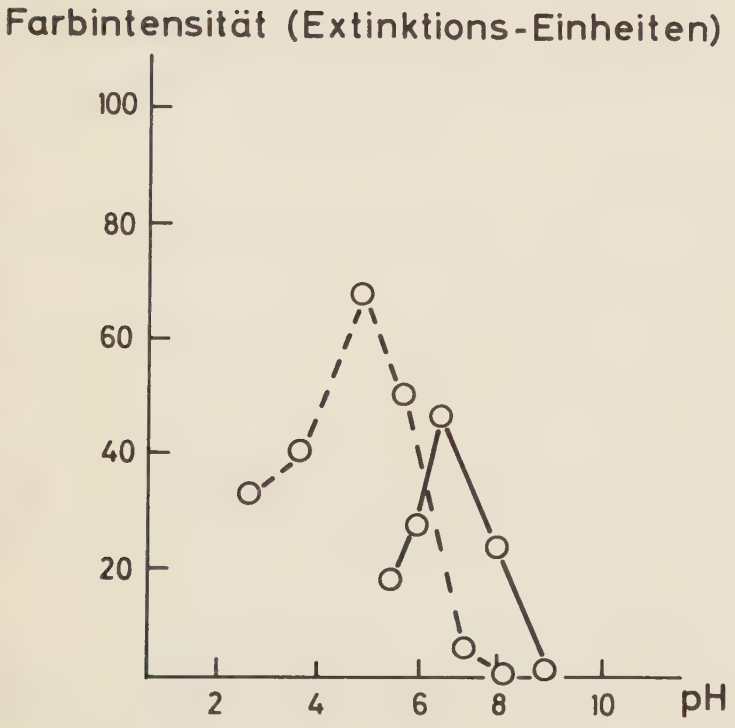


Abb. 11: Farbintensität der LAP-Fraktionen in Abhängigkeit vom pH-Wert in der Färbelösung ----- und in der Inkubationslösung ———

zu filtrieren, weil Farbstoffniederschläge die Färbung beeinträchtigen können.

Bei Prüfung verschiedener Farbstoffkonzentrationen erwies sich die Konzentration von 20 mg% als ausreichend, um eine maximale Farbintensität zu erreichen.

Die optimale Anfärbedauer für Agarelektropherogramme hängt von der LAP-Aktivität des verwendeten Urins ab. Bei Aktivitäten über 20 mU/ml Urin färbten wir eine Stunde mit einer Lösung aus folgenden Bestandteilen (1): Trismaleatpuffer 0,2 M, pH 6,0; LBNA $1{,}3 \cdot 10^{-4}$ M; Fast Salt Black K 20 mg%. Bei LAP-Aktivitäten im Urin, die unter 20 mU/ml Urin lagen, inkubierten wir die Elektropherogramme eine Stunde mit folgender Lösung (2): Trismaleatpuffer 0,2 M, pH 6,6; LBNA $1{,}3 \cdot 10^{-4}$ M; und färbten anschließend mit der unter (1) beschriebenen Farblösung eine weitere Stunde.

Die Menge der Inkubations- und Färbelösungen wurde so gewählt, daß die Präparate in der Färbeschale mindestens 5 mm von der Färbelösung bedeckt waren.

Der Einfluß der Temperatur auf die Anfärbung wurde im Bereich von 27 - 47 °C getestet. Die Intensität der Anfärbung nimmt bei gleichen Färbezeiten proportional der Temperatur zu. Bei Temperaturen bis 37°C sind die Einzelfraktionen gut darstellbar. Bei Temperaturen über 37°C färbt sich der Untergrund stärker mit dem ungekoppelten Farbstoff an. Deshalb wurde die Anfärbung im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C vorgenommen.

d) Entfärbung

Zur Entfärbung des diffusen roten Niederschlages des ungekoppelten Fast Salt Black K im Agar und zur Fixierung der Agarstreifen werden die Elektropherogramme für 16 - 24 Stunden in eine Lösung gelegt, die aus einem Gemisch von Methanol, Eisessig und Aquadest im Verhältnis 2 : 1 : 7 besteht. Es empfiehlt sich, die Lösung mehrfach in dieser Zeit zu wechseln.

e) Trocknung

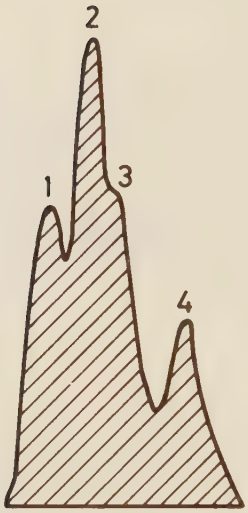
Danach trockneten wir den Agar auf dem Objektträger im Wär-

meschrank bei 37°C für 16 - 24 Stunden. Er wird dabei zu einem dünnen, transparenten Film, der fest auf seiner Unterlage, dem Objektträger, haftet.

f) Auswertung

Die Auswertung der Pherogramme erfolgte durch Extinktionsmessung mit dem Gerät "RB Analytrol" der Firma Beckman unter Verwendung eines Filters von 600 mμ und des Kammes Nr. B-5. Die Schlitzweite des Gerätes für den Meßlichtstrahl betrug dabei 0,5 mm. Durch dieses Gerät werden die einzelnen Enzymfraktionen als Integralkurven graphisch dargestellt (Abb. 12 und 13).

A.



B.

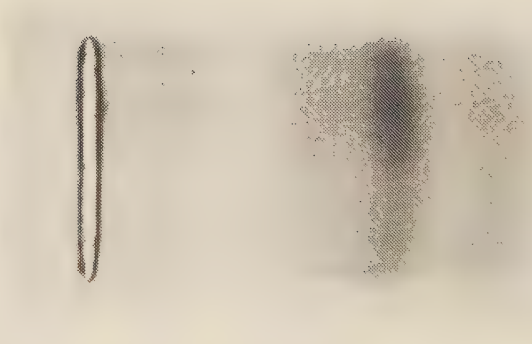


Abb. 12: Urin-LAP eines Patienten mit Amyloidase

A. Integralkurve des Extinktionsschreibers
B. Elektropherogramm

A.

B.

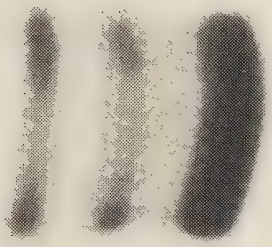


Abb. 13: Serum-LAP eines Patienten mit Amyloidnephrose

A. Integralkurve des Extinktionsschreibers
B. Elektropherogramm

II. METHODENKRITIK

A. Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu prüfen, trennten wir die LAP einer Urinprobe nach dem oben beschriebenen Verfahren achtzehn mal auf und bestimmten das LAP-Verteilungsmuster in rel.% durch Extinktionsmessung. Es wurde die relative Streuung der Methode (Standardabweichung) bei der Bestimmung der Einzelfraktion ermittelt und der daraus sich ergebende Variabilitätskoeffizient berechnet. Die Ergebnisse sind auf Tabelle III und IV wiedergegeben.

Tabelle III

Reproduzierbarkeit der Methode

Einzelwerte (rel.%)				
Nr.	Fraktion			
	1	2	3	4
1	25,5	34,0	24,4	15,9
2	27,7	33,3	25,0	13,8
3	26,0	34,0	24,0	16,0
4	25,8	34,8	24,7	14,6
5	23,9	32,6	23,9	19,5
6	25,6	36,5	23,1	14,8
7	25,5	36,6	23,3	14,4
8	24,0	37,3	21,6	16,9
9	24,5	33,9	22,6	18,8
10	26,5	37,2	25,0	11,3
11	26,3	37,5	23,6	12,5
12	24,4	40,0	22,2	13,3
13	25,0	36,5	23,0	15,3
14	25,8	32,7	24,1	17,2
15	24,7	32,7	24,5	18,0
16	25,5	39,5	23,2	11,6
17	27,6	33,8	26,1	12,3
18	28,1	33,8	23,9	14,0

Tabelle IV

Reproduzierbarkeit der Methode

Abkürzungen:	x	Einzelwert
	$\bar{x}$	Arithmetisches Mittel
	N	Zahl der Einzelwerte
	S	Standardabweichung
	VK	Variabilitätskoeffizient

Formeln: $\bar{x} = \frac{\Sigma x}{N}$ $\quad s = \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - N\bar{x}^2}{N-1}}$ $\quad VK = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}}$

Formel	Fraktion			
	1	2	3	4
Σx	462,4	636,7	428,2	270,2
N	18	18	18	18
$\bar{x}$	25,6	35,3	23,7	15,0
Σx^2	11903,90	22613,05	10207,00	4154,72
$\bar{x}^2$	655,36	1246,09	561,69	225,00
$N\bar{x}^2$	11796,48	22429,62	10110,42	4050,00
$\Sigma x^2 - N\bar{x}^2$	107,42	183,14	173,72	104,72
N - 1	17	17	17	17
$\bar{x}$	25,6	35,3	23,7	15,0
S	2,50	3,26	2,37	2,47
VK	9,7	9,2	10,0	16,4

B. Qualitative Spezifität der Färbemethode

a) Anfärbung kristallisierter Leucinaminopeptidase

Zur Prüfung der Spezifität des gewählten LAP-Färbeverfahrens trennten wir unter Standardbedingungen kristallisierte Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinse* auf. Nach der Anfärbung ergab sich eine schmale blaue Bande, die die Wande-

* Serva Nr. 27717

rungsgeschwindigkeit von Albumin hatte. Nach Zugabe von $MnCl_2$ (10^{-4} M) als Aktivator (32) nahm die Farbintensität der Enzymfraktionen bei allen Präparaten zu (Abb. 14).

Ergebnis: Mit der gewählten Färbmethode werden Leucinaminopeptidase-aktive Fraktionen im Agar dargestellt. Die Aktivität des dargestellten Enzyms wird durch einen typischen Aktivator ($MnCl_2$) erhöht.

b) Elution der LAP aus dem Agar

Um nachzuweisen, daß die im Agarpherogramm angefärbten Zonen LAP-Aktivität besitzen, wurden diese Zonen eluiert und im Photometer auf ihre LAP-Aktivität untersucht. Zum Vergleich bestimmten wir die LAP-Aktivität im Eluat von Zonen, die nicht angefärbt waren.

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen: Wir trennten einen Urin mit vier LAP-aktiven Banden unter Standardbedingungen auf. Dann wurde durch ein parallel aufgetrenntes und angefärbtes Vergleichspräparat die Lage der Fraktionen ermittelt. Diese schnitten wir ohne vorherige Anfärbung aus dem Originalpräparat in drei gleich großen Teilen heraus (Abb. 15).

Der erste Teil umfaßte Albumin und Fraktion 1 (Sektion A), der zweite Teil Fraktion 2 und 3 (Sektion B) und der dritte Teil Fraktion 4 mit dem Auftragsgraben (Sektion C).

Aus einem anderen Präparat wurde der Auftragsgraben mit einem entsprechend großen Agarstück, das den oben beschriebenen Stücken in der Größe entsprach (Sektion F), sowie ein Agarstück kathodenwärts vom Graben (Sektion D) und die Albuminfraktion vor der LAP-Fraktion 1 (Sektion E) herausgeschnitten. Alle diese Agarstücke wurden unter Kühlung mit Eiswasser im Ultra-Turrax TP 18/2 N* eine Minute homogenisiert und anschließend fünf Minuten bei ca. 1000 g zentrifugiert. Dann bestimmten wir im klaren Überstand die LAP-Aktivität mit dem LAP-Farbtest nach Boehringer**. Zum genaueren Nachweis der zu erwartenden geringen LAP-Aktivität im Eluat modifizierten wir die

---

* Firma Janke und Kunkel, KG, Staufen im Breisgau

** C.F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim

Kristallisierte LAP

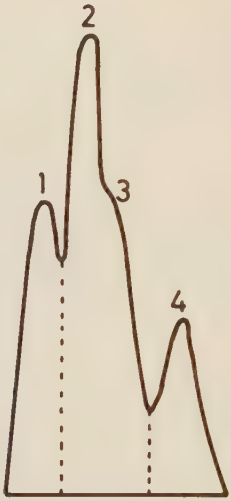
A B

Abb. 14: Kristallisierte LAP aus Rinderaugenlinse:
A ohne Zusatz von $MnCl_2$
B mit Zusatz von $MnCl_2$ (10^{-3} M)

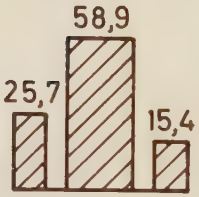
Eluat der Urin-LAP A

Enzymogramm:

A. Extinktionskurve



B. Aktivitäts-
verteilung (rel%)



Eluat:
Aktivitätsverteilung
(rel%)

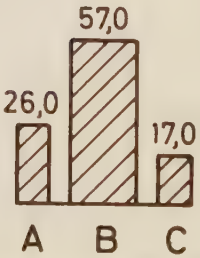


Abb. 15: Vergleich zwischen der Aktivitätsverteilung der Urin-LAP im Enzymogramm (Extinktions-Einheiten) und im Agareluat (Photometerwerte)

Enzymbestimmung folgendermaßen: Wir inkubierten 0,5 ml Eluat eine Stunde bei 42°C in 2 ml 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,2 und 0,1 ml 0,025 M Leucin-p-nitranilid. Die Farbintensität wurde mit einem Eppendorfphotometer bei der Wellenlänge von 405 mμ und einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt.

Die Agarstreifen, die keine Anfärbung im Vergleichspräparat aufwiesen (Sektion D), sowie die Albuminfraktion (Sektion E) zeigten auch keine LAP-Aktivität. Das Agarstück, das den Graben umfaßte (Sektion F), besaß eine geringe LAP-Aktivität (durchschnittlich 17 %). Möglicherweise handelte es sich dabei um Enzymanteile, die nicht elektrophoretisch gewandert sind.

Die drei herausgeschnittenen Agarteile, denen im Vergleichspräparat Farbbanden entsprachen, wiesen alle LAP-Aktivität auf. Die Verteilung der eluierten Aktivitäten aus diesen Zonen geht aus Tabelle V hervor.

Im Vergleich mit der durch Extinktionsmessung ermittelten Aktivitätsverteilung auf den angefärbten Pherogrammen ergab sich übereinstimmend, daß Sektion B (Fraktion 2 und 3) die höchste, Sektion A (Fraktion 1 und Albumin) die zweithöchste und Sektion C (Fraktion 4 und Graben) die niedrigste Aktivität aufwiesen (Abb. 15).

Nur in einem Fall war die Aktivität der Sektion C geringfügig höher als die der Sektion A. Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß Sektion C aus Fraktion 4 und Graben besteht. Außerdem müssen erhebliche Fehlerquellen (Tab. V) bei der Aktivitätsbestimmung der Agareluate, die sich bei der angewandten Methode nicht vermeiden lassen, berücksichtigt werden. Sie dürften vorwiegend auf ungleichmäßigen Aktivitätsverlusten der LAP beim Homogenisieren der Agarteile beruhen.

Ergebnis: Die mit dem gewählten Enzymfärbeverfahren dargestellten Banden im Elektropherogramm enthalten LAP-Aktivität. Dabei entspricht die durch Extinktionsmessung festgestellte Fraktionsverteilung im Enzymogramm annähernd der in Agareluaten nachweisbaren Verteilung der Fermentaktivität.

Tabelle V

Elution der Urin-LAP

Nr.	Sektion		
	A	B	C
1	27	62	11
2	14	70	16
3	29	48	23
4	34	48	18
$\bar{x}$	26,0	57,0	17,0
S	8,5	13,8	4,9
VK	32,5	24,2	28,8

(1) LAP-Aktivität im Agareluat (Photometerwerte in rel.%)

Nr.	Photometerwerte
1	20
2	21
3	24
4	20
5	23
6	25
$\bar{x}$	22,1
S	2,84
VK	12,9

(2) Reproduzierbarkeit der Methode (Extinktionsdifferenzen)

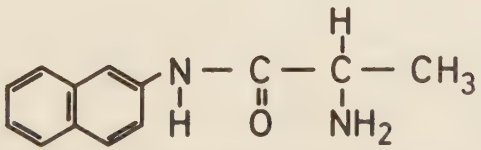
C. Quantitative Spezifität der Färbemethode

Wir stellten eine Serie von Pherogrammen mit absteigender LAP-Aktivität her und bestimmten mit dem Photometer die Aktivität der eluierten Fraktionen. Dazu trugen wir in die verbreiterten Agargräben je 45 µl einer Lösung kristallisierter Leucinaminopeptidase auf, die Enzymaktivitäten von 8, 4, 2 und 1 mU/ml Lösung enthielt. Anschließend führten wir die Elektrophorese unter Standardbedingungen durch. Anhand von parallel aufgetrennten, jedoch anschließend angefärbten Enzymogrammen schnitten wir die Fraktionen in gleich großen Agarsektionen heraus, homogenisierten sie unter Kühlung mit Eiswasser im Ultra-Turrax eine Minute, zentrifugierten sie fünf Minuten bei ca. 1000 g und maßen im klaren Überstand photometrisch die LAP-Aktivität.

Ergebnis: Die Intensität der LAP-Anfärbung im Agargel ist linear von der im Agar vorhandenen LAP-Aktivität abhängig (Abb. 16).

D. Prüfung der Substratspezifität

Aus der eingangs erwähnten Definition der LAP ist abzuleiten, daß LBNA nicht das einzige spaltbare Substrat der nachweisbaren Peptidase-Aktivität sein muß, sondern daß mit diesem Substrat auch Peptidasen, die zusätzlich andere Substrataffinitäten besitzen, erfaßt werden. Uns interessierte im Rahmen dieser Untersuchung die Peptidaseaktivitätsverteilung im Pherogramm unter dem Angebot von D,L-Alanin-ß-naphthylamid (ABNA)* und L-Glycin-ß-naphthylamid (GBNA)* neben dem oben beschriebenen LBNA.



D,L-Alanin-ß-naphthylamid (ABNA)

* Schuchardt GmbH, München 13, Ainmillerstr. 25

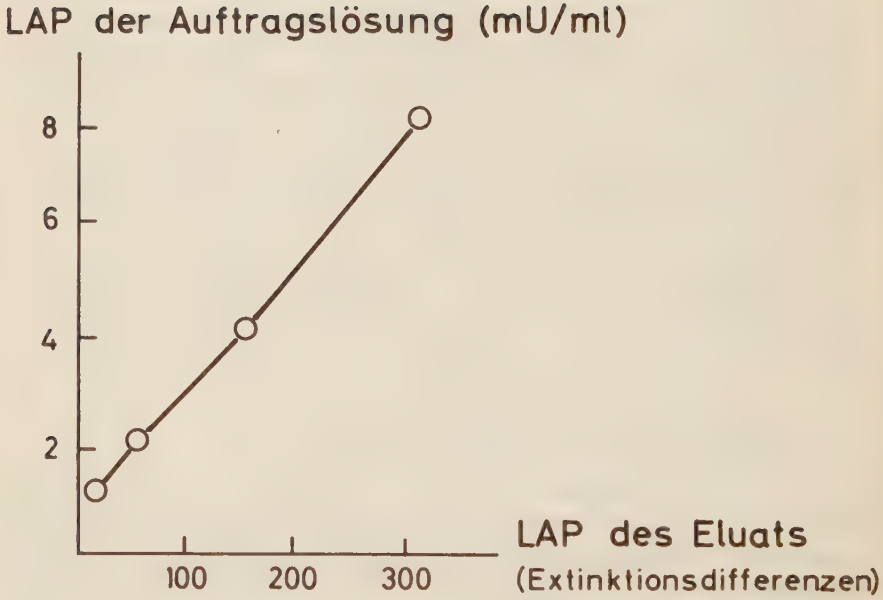
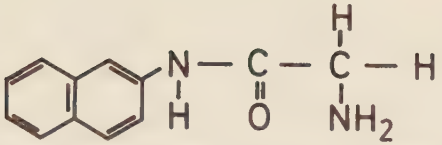


Abb. 16: Abhängigkeit der LAP-Aktivität des Agareluats von der LAP-Aktivität der Auftragslösung



L-Glycin-ß-naphthylamid (GBNA)

Diese Substanzen wurden dem Enzymfärbeansatz anstelle des LBNA in einer Konzentration von 20 mg% zugesetzt. Das Ergebnis geht aus Tabelle VI hervor. Bei allen drei Substraten stellten sich vier Fraktionen dar. Erstaunlicherweise war das LAP-Verteilungsmuster praktisch identisch (Abb. 17). Der einzige, aber signifikante Unterschied zeigte sich beim Vergleich der mit diesen Substraten gemessenen Gesamt-LAP-Aktivitäten. Die Bestimmung erfolgte durch Messung der Gesamtextinktion der jeweiligen Pherogramme. Dabei zeigte sich ein Verhältnis der gemessenen Extinktionen bei Anwendung von ABNA, LBNA und GBNA von 2,4 : 1,4 : 1.

Ergebnis: Die mit Hilfe von L-Leucyl-ß-naphtylamid dargestellten Fermentfraktionen setzten nicht nur LBNA, sondern auch D,L-Alanin-ß-naphthylamid und L-Glycin-ß-naphthylamid um.

Wir erfaßten also mit unserer Auftrennungs- und Färbemethode im Rahmen dieser Untersuchung mehrere Peptidasen. Die Aktivitätsverteilung im Enzymogramm bleibt auch bei Umsatz unterschiedlicher Substrate gleich.

Tabelle VI

Bestimmung der Peptidaseaktivität im Urin eines Patienten mit Amyloidnephrose unter Verwendung von LBNA, ABNA und GBNA als Enzymsubstrate

(Extinktions-Einheiten in rel.%)

Fraktionen	1	2	3	4
Substrat LBNA	28,6	36,7	20,4	14,2
	25,8	39,6	19,0	15,5
	25,0	34,3	21,9	18,8
	25,0	38,4	21,2	15,4
	31,0	37,9	20,7	10,3
	23,8	38,1	21,4	16,7
	26,4	34,0	22,6	17,0
	26,1	34,8	21,7	17,4
	25,5	33,3	23,5	17,6
	29,3	36,6	19,5	14,6
$\bar{x}$	26,6	36,3	21,1	15,7
S	2,84	3,22	2,47	2,2
VK	10,6	8,8	11,7	14,0
Substrat ABNA	27,1	33,6	22,4	16,8
	26,0	30,8	24,0	19,2
	27,5	34,3	23,5	14,7
	27,7	34,3	23,4	14,6
	24,8	35,9	23,4	15,9
	28,7	38,2	22,1	11,0
	30,5	36,4	18,2	14,9
	26,7	34,2	20,5	18,5
	27,0	33,6	22,1	17,2
	25,4	44,3	15,9	14,4
$\bar{x}$	27,1	35,5	21,5	15,7
S	2,46	4,2	3,0	2,5
VK	9,0	11,8	13,9	15,9
Substrat GBNA	24,0	40,0	20,0	16,0
	28,9	34,2	21,1	15,8
	25,0	35,7	21,4	17,9
	23,8	35,7	21,4	19,0
	26,2	35,2	21,9	16,7
	25,5	34,0	21,3	19,1
	25,8	35,5	22,6	16,1
	20,6	47,0	17,7	14,7
	25,6	35,9	23,1	15,4
	22,6	38,6	19,4	19,4
$\bar{x}$	24,8	37,1	20,9	17,0
S	2,27	4,6	2,5	1,8
VK	9,1	12,3	11,9	10,5

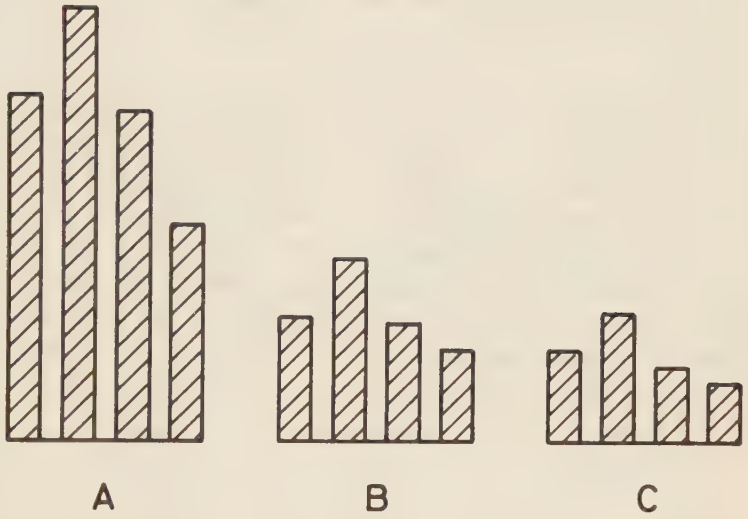


Abb. 17: Verteilung der Peptidaseaktivität (Extinktions-Einheiten in rel.%) im Urin eines Patienten mit Amyloidnephrose bei Verwendung folgender Substrate:

A D,L-Alanin-ß-naphthylamid
B L-Leucin-ß-naphthylamid
C L-Glycin-ß-naphthylamid

III. LAP-AKTIVITÄTSVERTEILUNG IM URIN GESUNDER

Von 18 gesunden Versuchspersonen trennten wir die Serum- und Urin-LAP elektrophoretisch nach dem oben beschriebenen Verfahren auf. Gleichzeitig wurden zur Kontrolle die Gesamtaktivität im Urin und Serum mit dem LAP-Test der Firma Boehringer bestimmt.

Ergebnis: Im Serum ließ sich immer eine Fraktion nachweisen. Im Urin dagegen traten immer zwei Fraktionen auf, wenn von 100 ml Ausgangsmenge auf etwa 0,6 ml eingeengt wurde. Bei stärkerer Einengung fanden wir in zwei Fällen eine dritte Fraktion. Das LAP-Verteilungsmuster bestimmten wir durch Extinktionsmessung in Relativprozenten. Aus Tabelle VII gehen die einzelnen Daten hervor. In allen Fällen war die LAP-Aktivität der anodisch gelegenen Fraktion 1 höher als die der kathodisch gelegenen Fraktion 2.

Tabelle VII

LAP-Aktivität im Urin von Normalpersonen

Nr.	Gesamtaktivität in mU/ml	Rel.% (Extinktionsschreiber-Einheiten) Fraktionen 1	2
1	3,5	70,0	30,0
2	4,8	77,3	22,7
3	1,7	71,9	28,1
4	11,7	73,2	26,8
5	0,7	76,3	23,7
6	5,9	58,1	41,9
7	2,7	84,4	15,6
8	3,9	90,4	9,6
9	3,0	83,9	16,1
10	3,6	66,7	33,3
11	4,8	84,3	15,7
12	4,2	70,0	30,0
13	3,9	68,1	31,9
14	4,4	66,0	34,0
15	3,7	88,9	11,1
16	3,6	64,3	35,7
17	2,4	68,8	31,2
18	1,6	76,2	23,8
		$\bar{x}$ 74,4	25,6
		S 8,80	9,19
		VK 11,8	35,5

IV. LAGE DER LAP-FRAKTIONEN IM EIWEISSPHEROGRAMM

Um die Lokalisation der LAP-Fraktionen im Serum und Urin von gesunden Versuchspersonen und einem Patienten mit Amyloidnephrose im Verhältnis zum Eiweißelektropherogramm zu ermitteln, färbten wir ein Serumpherogramm, das unter denselben Bedingungen aufgetrennt worden war, mit Amidoschwarz an. Die Ergebnisse sind auf Abb. 18 zusammengestellt. Bemerkenswert ist, daß die LAP-Fraktionen des Serums und Urins gesunder Versuchspersonen eine deutlich unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen. Die Serum-LAP wandert schneller. Von dieser Beobachtung ausgehend ist es unwahrscheinlich, daß bei gesunden Versuchspersonen die LAP-Aktivität des Urins mit der des Serums identisch ist.

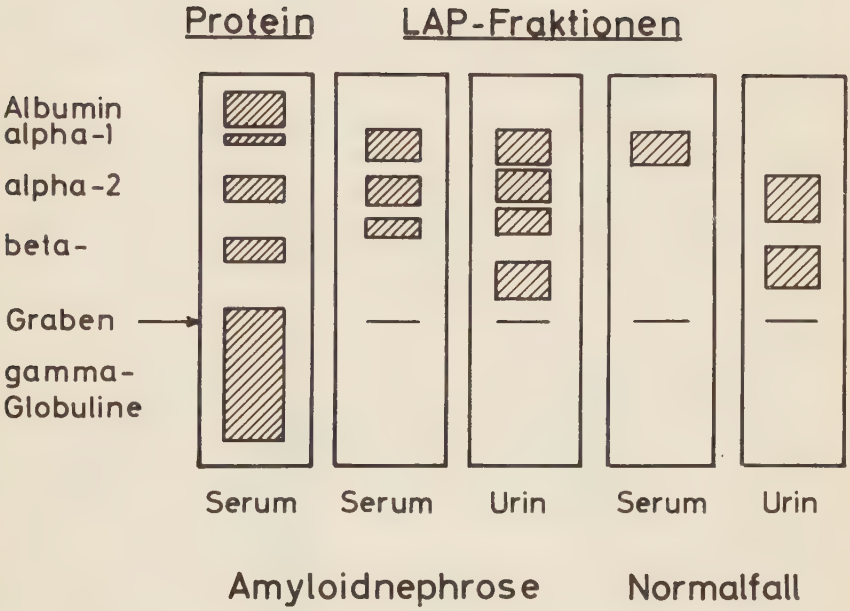


Abb. 18: Wanderungsgeschwindigkeit der LAP-Fraktionen im Verhältnis zu den Serumproteinen

V. D I S K U S S I O N

In der einzigen, bisher bekannt gewordenen Arbeit zur elektrophoretischen Auftrennung der Urin-LAP von SMITH und RUTENBURG (53) wird im Gegensatz zu unseren Untersuchungen im Urin des Gesunden bei Anwendung der Stärkegelelektrophorese nur eine Fraktion mit Peptidaseaktivität gefunden. Eigene Vergleichsversuche mit dem Urin eines Patienten mit Amyloidnephrose, der sowohl mit der Stärkegelmethode nach SMITHIES (56) als auch mit unserer Methode im Agargel aufgetrennt wurde, ergaben folgende Ergebnisse (Abb. 19).

Im Stärkegel fand sich regelmäßig nur eine Fraktion, während im Agargel vier Fraktionen mit LAP-Aktivität dargestellt werden konnten. Auch im Urin gesunder Versuchspersonen fand sich bei Anwendung der Stärkegelelektrophorese nur eine Fraktion. Da sich Stärkegelpherogramme außerdem nicht quantitativ auswerten lassen, erscheint uns die Stärkegelelektrophorese ungeeignet zur Darstellung der Urin-LAP.

Papierelektrophoresen haben eine bedeutend längere Auftrennzeit und bewirken einen erheblichen enzymatischen Aktivitätsverlust. METHFESSEL beobachtete einen Aktivitätsverlust von durchschnittlich 78,8 % bei 7 ½ stündiger Papierelektrophorese der aus Rinderaugen kristallisierten Leucinaminopeptidase (32).

Die Methode der Säulenchromatographie ist für klinische Zwecke zu aufwendig. Zudem treten bei dieser Methode stärkere Verdünnungen des untersuchten Urins auf, der normalerweise schon eine geringe LAP-Aktivität besitzt.

Unsere Methode dagegen verursacht nur eine geringe Enzymaktivierung durch die kurze Auftrenndauer von weniger als zwei Stunden. Die Agargelelektrophorese ist einfach zu handhaben und läßt sich semi-quantitativ auswerten.

A B

Abb. 19: Stärkegelelektrophorese
A Serumproteine B Urin-LAP

Z U S A M M E N F A S S U N G

Da die elektrophoretische Auftrennung der sogenannten Leucinaminopeptidase (LAP) des Harns mit der Papier- und Stärkegelelektrophorese sich als ungenügend erwies, wurde eine agarelektrophoretische Methode ausgearbeitet. Mit ihr konnten bis zu 4 Fraktionen mit Peptidaseaktivität im Sinne der sogenannten Leucinaminopeptidase im Urin gewonnen werden.

Methodenkritische Analysen zeigten eine gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens und ließen eine ausreichende Spezifität der Färbemethode erkennen. Das Verfahren läßt sich auch semiquantitativ auswerten. Der Vergleich der färberisch im Agar erhaltenen Aktivitätsverteilung mit Aktivitätsmessungen des Enzyms in Eluaten der entsprechenden Zonen des Elektropherogramms erbrachte eine gute Übereinstimmung der mit beiden Methoden erhaltenen Enzymaktivitätsverteilung.

Es wurde ferner nachgewiesen, daß die L-Leucin-ß-naphthylamid - spaltenden Fermentfraktionen eines Patienten mit Amyloidnephrose auch andere Substrate, wie D,L-Alanin-ß-naphthylamid und L-Glycin-ß-naphthylamid, umsetzen können. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der relativen Aktivitätsverteilung der einzelnen Fraktionen, während die Absolutwerte der Gesamtaktivitäten bei den drei untersuchten Substraten deutlich differierten.

Im Urin von achtzehn gesunden Versuchspersonen ließen sich regelmäßig zwei LAP-Fraktionen darstellen, von denen die anodisch wandernde Fraktion immer die höchste LAP-Aktivität enthielt. Im Serum dagegen trat immer eine Fraktion auf, die schneller als die Urinfraktionen wanderte und daher nicht mit der Urin-LAP identisch sein dürfte.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ARAKI, C.: Structure of the Agarose Constituent of Agar-Agar. Bull. Chem. Soc. Japan 29, 543-546 (1956).

2. BECKER, J., E. EBNER und K.H. KÄRCHER: Neue Möglichkeiten zum Studium der klinischen Strahlenwirkung. Strahlentherapie 109, 357-373 (1959).

3. BECKMANN, L. and M. GRIVEA: Variations in Serum Leucine Aminopeptidase in Pregnant Women and in Newborn Children. Acta Paediat. Scand. 54, 578-580 (1965).

4. BEHAL, F.J., C.B. KANAVAGE, and R.D. HAMILTON: Separation of Leucyl-Aminopeptidase Components in Normal Human Sera by DEAE Cellulose Column Chromatography. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 109, 411-412 (1962).

5. BEHRENS, O.K. und M. BERGMANN: Cosubstrate der Proteolyse. J. Biol. Chem. 129, 587-607 (1939).

6. BERGMANN, H.: Die Bestimmung von Zellenzymen der Niere im Harn. Habilitationsschrift Göttingen, März 1965.

7. BERGMANN, H. und F. SCHELER: Der Nachweis tubulärer Funktionsstörungen der Niere durch Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität im Harn. Klin. Wschr. 42, 275-279 (1964).

8. BERGMANN, H. und F. TRUSS: Harnenzyme als Indikator tubularer Nierenschäden. Med. Welt 34, 1760-1764 (1964).

9. BRAUN-FALCO, O., K. SALFELD und F. BRAUN-FALCO: Über das Verhalten der LAP im Blut. Klin. Wschr. 37, 231-235 (1959).

10. BURSTONE, M.S. und E.K. WEISBURGER: Development of New Histochemical Substrates and Diazonium Salts for the Demonstration of Aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. 9, 949 (1961).

11. DIOGUARDI, N., A. AGOSTINI, G. FIORELLI, A. TITOBELIO, E. GIRLA, C.C. MARONI, M. DONISELLI, B. LOMANTO e F. FABRI: Studio mediante cromatografia su colonna di dietilamino-etilcellulosa (DEAE) della leucinaminopeptidasi serica in corso die affesioni epatobiliari. Minerva med. 53, 167-170 (1962).

12. DURBS, C.A., Ch. VIVONIA, and J.M. HILBURN: Sub-fractionation of Human Serum Leucine Aminopeptidase. Nature (London) 191, 1203-1204 (1961).

13. FELLENBERG, R., H. EPPENBERGER, R. RICHTERICH und H. AEBI: Das glykolytische Enzymmuster von Leber, Niere, Skelettmuskulatur, Herzmuskel und Großhirn. Biochem. Z. 336, 334-350 (1962).

14. FOLK, J.E. and M.S. BURSTONE: Chromogenic Leucyl Substrates for Aminopeptidase and Papain. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 89, 473-476 (1953).

15. FRÖHLICH, Ch., P. HOPPE-SEYLER und H. NIETH: Untersuchungen über Aktivität und Iso-Enzymmuster der Lactatdehydrogenase im Serum und Urin bei akutem Nierenversagen. II. Tagg. Südwestdtsch. Ges. Inn. Med., Freiburg/Brg. 1965.

16. GLÄSSER, D. und H. HANSON: Kristallisierte Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinse. Naturwissenschaften 50, 595-596 (1963).

17. GLÄSSER, D. und H. HANSON: Ein weiteres Verfahren zur Gewinnung kristallisierter Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinse. Naturwissenschaften 51, 110-111 (1964).

18. GLENNER, G.G.: The Preservation of Peptidase-Activity Localisation Using ß-naphthylamide Substrates. J. Histochem. Cytochem. 10, 257-258 (1962).

19. GÖGGEL, K.H., W. CREUTZFELDT und J. MURUCAS: Das Verhalten der Leucinaminopeptidase und anderer Enzyme im Serum bei Leber-, Gallen- und Pankreaserkrankungen. Dtsch. med. Wschr. 85, 1808-1816 (1960).

20. GOLDBARG, J.A. and A.M. RUTENBURG: The Colorimetric Determination of Leucin-Aminopeptidase in Urine and Serum of Normal Subjects and Patients with Cancer and other Diseases. Cancer (N.Y.) 11, 285-291 (1958).

21. GOLISCH, G.: Die Leucinaminopeptidaseaktivität im Harn von Patienten mit malignen Tumoren. Klin. Wschr. 38, 968-970 (1960).

22. GOMORI, G.: Enzymatic Hydrolysis of Acyl Naphthylamines. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 85, 570-572 (1954).

23. GOMORI, G.: Chromogenic Substrates for Aminopeptidase. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 87, 559-561 (1954).

24. GREEN, M.N., K.C. TSOU, R. BRESSLER, and A.M. SELIGMAN: Colorimetric Determination of Leucinaminopeptidase Activity with L-leucyl-β-naphthylamide-hydrochloride. Arch. Biochem. Biophys. 57, 458-474 (1955).

25. Handbuch der Histochemie: Enzyme. Band VII/4 Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1964.

26. KLAUS, D.: Über Aminopeptidasen im menschlichen Organismus. Ärztl. Forsch. 15, 548-553 (1961).

27. KLAUS, D. and P. BIRON: Electrophoretic Behaviour of Serum Angiotensinase. Nature (London) 204, 381-383 (1964).

28. KOWLESSAR, O.D.: Localisation of Leucin Aminopeptidase in Serum and Body Fluids by Starchgel Electrophoresis. J. Clin. Invest. 39, 671-675 (1960).

29. KOWLESSAR, O.D., L.J. HAEFFNER, and D.M. RILEY: Localisation of Serum Leucine Aminopeptidase, 5-nucleotidase, and Nonspecific Alkaline Phosphatase by Starchgel Electrophoresis Clinical and Biochemical Significance in Disease States. Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 836-843 (1961).

30. LAWRENCE, S.H., P.J. MELNIK, and H.E. WEIMER: A Species Comparison of Serum Proteins and Enzymes by Starchgel Electrophoresis. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 105, 572-575 (1960).

31. LINDERSTROM-LANG, K.: Über Darmerepsin. Z. physiol. Chem. 182, 151-174 (1929).

32. METHFESSEL, J.: Papierelektrophorese und Enzymaktivität. 1. Untersuchungen über Urease, Katalase und Leucinaminopeptidase. Wiss. Z. Univ. Halle 12, 129-135 (1963).

33. MONIS, B.: Electrophoretic Evidence for Isozymes of Aminopeptidase in the Rat. Serum, Renal and Urinary Enzymes Splitting D-L alanyl-2-naphthylamide and L-leucyl-2-naphthylamide. 2. Internat. Kongr. Histo- u. Cytochem. Frankfurt/M 1964, Hrsg. SCHIEBLER/PEARSE/WOLFF. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer, 1964.

34. NACHLAS, M.M., D.T. GRAWFORD, and A.M. SELIGMAN: The Histochemical Demonstration of Leucine Aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. 5, 264-278 (1957).

35. NACHLAS, M.M., B. MONIS, D. ROSENBLATT, and A.M. SELIGMAN: An Improvement in the Histochemical Localisation of Leucine Aminopeptidase with a New Substrate, L-leucyl-4-methoxy-2-naphthylamide. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 261-264 (1960).

36. NAGEL, W. und F. WILLIG: Verteilung von proteolytischen Fermenten in Organen und Zellbestandteilen. Naturwissenschaften 51, 115 (1964).

37. NAGEL, W., F. WILLIG und F.H. SCHMIDT: Über die Aminosäure arylamidase - (sog. Leucinaminopeptidase) - Aktivität im menschlichen Serum. Klin. Wschr. 42, 447-449 (1964).

38. NIETH, H. und P. SCHOLLMEYER: Citrat-Stoffwechsel der menschlichen Niere. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 71, 693-696 (1965).

39. NIETH, H. and P. SCHOLLMEYER: Substrate Utilization of Human Kidney. Nature (London) 209, 1244-1245 (1966).

40. NIETH, H., F. DÜRR, M. EGGSTEIN, B. HÖHMANN und P. SCHOLLMEYER: Extraktion der freien Fettsäuren durch die menschliche Niere. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 70, 681-684 (1964).

41. PATTERSON, E.K.: Diskussionsbeitrag. Proc. Histochem. Soc. J. Histochem. Cytochem. 10, 674 (1962).

42. PATTERSON, E.K., A. KOPPEL, and SHU-HSI HSIAO: Evidence from Purification Procedures, that the Enzyme which Hydrolyses L-leucyl-naphtylamide is not the Classical Leucin-Aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. 9, 608-609 (1962).

43. PATTERSON, E.K., SHU-HSI HSIAO, and A. KOPPEL: Studies on Dipeptidases and Aminopeptidases. 1. Distinction Between Leucine Aminopeptidase and Enzymes that Hydrolyse L-leucyl-ß-naphthylamide. J. Biol. Chem. 238, 3611-3620 (1963).

44. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry: Oxford, Pergamon Press, 1961.

45. RUTENBURG, A.M., E.E. SMITH, and E.P. PINEDA: Electrophoretic Patterns of Serum Leucine Aminopeptidase in Patients with Pancreatic and Hepatobiliary Disease. Surg. Forum 12, 374-376 (1961).

46. SCHELER, F. und H. BERGMANN: Erhöhte Aminopeptidase-Aktivität im Urin bei akutem Nierenversagen. European Dialysis and Transplant Association. Proceedings 1964, Vol. 1,1

47. SCHMIDT, E. und F.W. SCHMIDT: Enzymmuster menschlicher Gewebe. Klin. Wschr. 38, 957-962 (1960).

48. SCHOBEL, B.: Die Auftrennung der Aminopeptidase in Stärkegel. Mitt. Enzym-Kolloquium 1. Med. Klin. Wien, März 1962.

49. SCHOBEL, B. und F. WEWALKA: Die Heterogenität der Leucinaminopeptidase. Untersuchungen von Organen und Serum bei Leber-, Gallen- und Pankreaserkrankungen. Klin. Wschr. 40, 1048-1056 (1962).

50. SCHÖN, H., B. RÄSSLER und H.J. WEYERGRAF: Zur Bestimmung der Leucinaminopeptidase-Aktivität im Serum bei Leber-, Gallen- und Pankreaserkrankungen. Z. Klin. Chem. 1, 73-78 (1963).

51. SCHOLLMEYER, P. und H. NIETH: Lactat, Pyruvat und Glucose im Stoffwechsel der gesunden menschlichen Niere. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 72, 394-397 (1966).

52. SMITH, E.E. and A.M. RUTENBURG: Electrophoretic Behaviour of an Amino Peptidase of Human Tissues and Serum. Nature (London) 197, 800-801 (1963).

53. SMITH, E.E. and A.M. RUTENBURG: Starchgel Electrophoresis of Human Tissue. Enzymes which Hydrolyse L-leucyl-ß-naphthylamide. Science 152, 1256-1257 (1966).

54. SMITH, E.E., E.P. PINEDA, and A.M. RUTENBURG: Localisation of Serum Leucine Aminopeptidase Activity by Paperelectrophoresis. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 110, 683-687 (1962).

55. SMITH, E.E., J.T. KAUFMANN, and A.M. RUTENBURG: The Partial Purification of an Amino Acid Naphthylamidase from Human Liver. J. Biol. Chem. 240, 1718-1721 (1965).

56. SMITHIES, O.: An Improved Procedure for Starchgel Electrophoresis: Further Variations in the Serum Proteins of Normal Individuals. Biochem. J. 71, 585-587 (1959).

57. SPACKMANN, D.H., E.L. SMITH, and D.M. BROWN: Leucine Aminopeptidase. A. Isolation and Properties of the Enzyme from Swine Kidney. J. Biol. Chem. 212, 255-299 (1955).

58. SZÁSZ, G, P. BARANYAI, Z.S. CZIRBESZ und P. CSÁTZI: Über die Enzymurie beim nephrotischen Syndrom. Klin. Wschr. 43, 783-788 (1965).

59. WEBER, G.: Kidney Enzymes of Gluconeogenesis, Glucogenesis, Glucolysis, and Direct Oxydation. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 108, 631-634 (1961).

60. WIEME, R.J.: Agar Gel Electrophoresis. 1. Aufl. Amsterdam, London, New York, Elsevier Publishing Comp., 1965.

61. WINTERSBERGER, E. und H. TUPPY: Zonen-Elektrophorese von Aminopeptidasen in Stärkegel. M. H. Chem. 91, 406-444 (1960).

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. H.E. Bock, Direktor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Klinik zu arbeiten.

Herrn Professor Dr. H. Nieth danke ich für die Überlassung des Themas und die Einführung in die Problematik der Arbeit.

Bei Herrn Dr. Ch. Fröhlich möchte ich mich für seine verständnisvolle und tatkräftige Unterstützung bedanken.

LEBENSLAUF

Am 7.5.1942 wurde ich, Michael Langlotz, als Sohn des Professors für klassische Archäologie Ernst Langlotz und seiner Frau Friederike, geb. Pummerer, in Erlangen geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Poppelsdorf bei Bonn und des Nikolaus-Cusanus-Gymnasiums in Bad Godesberg legte ich dort Ostern 1961 die Reifeprüfung ab. Im gleichen Jahr begann ich in Bonn das Studium der Medizin, das ich nach dem Physikum in Tübingen fortsetzte.
Hier legte ich im Winter 1967/68 das Medizinische Staatsexamen ab.

Meine Medizinalassistentenzeit verbrachte ich in Oldenburg und Berlin. Im Januar 1970 erhielt ich die Approbation als Arzt und bin seit dem 1. April 1970 am Max-Planck-Institut für physikalische Chemie in Göttingen tätig.